

ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

М. А. Колков

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ДОБАВОК В ХИМИКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОМ АНАЛИЗЕ

Государственный комитет судебных экспертиз Республики Беларусь
Управление по Витебской области

В работе представлены методики количественного определения димедрола, клозапина и фенobarбитала в трупной крови людей, причина смерти которых, по мнению судебно-медицинских экспертов, была вызвана передозировкой лекарственных препаратов. Количественное определение выполняли методом стандартной добавки. Исследование проводили методами тонкослойной, газовой и высокоэффективной жидкостной хроматографии, а также методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием. Использование внутренних стандартов увеличивает точность количественного определения. Методики изолирования и количественного определения димедрола, клозапина и фенobarбитала могут быть использованы в практической работе токсикологических лабораторий.

Ключевые слова: количественный анализ, метод стандартной добавки, газовая хроматография, газовая хроматография с масс-спектрометрией, высокоэффективная жидкостная хроматография.

ВВЕДЕНИЕ

Количественное определение токсического компонента является завершающим этапом химико-токсикологического исследования. Основным объектом исследования в данном случае является кровь, так как в подавляющем большинстве литературных источников токсические и летальные концентрации приведены именно для крови [1].

Первым этапом количественного определения токсических компонентов является изолирование их из крови. Основными методами изолирования лекарственных веществ из крови являются жидкость-жидкостная экстракция и твердофазная экстракция. В случае и жидкость-жидкостной экстракции, и твердофазной экстракции степень изолирования вещества определяется коэффициентом распределения его между кровью (плазмой крови, сывороткой) и экстрагирующей жидкостью или сорбентом [2].

Кровь как аналитическая матрица отличается высокой сложностью при изолировании лекарственных или наркотических веществ методом жидкость-жидкостной экстракции. Замена крови на воду для построения градуировочного графика в координатах «масса (концен-

трация) аналитического компонента — сигнал прибора (оптическая плотность, высота или площадь хроматографического пика)» неприемлема, так как величина коэффициента распределения токсиканта между водой и экстрагирующей жидкостью может не совпадать с величиной коэффициента распределения между кровью и экстрагирующей жидкостью. Воду вместо крови можно использовать только в том случае, если известны оба коэффициента распределения, чтобы внести соответствующую поправку в результат определения. В противном случае необходимо использовать так называемую «бланковую» кровь, что вызывает определённые трудности.

По совокупности экспериментальных операций наиболее простым методом количественного определения лекарственных и наркотических веществ в крови является метод стандартной добавки. Он обеспечивает наибольшую точность количественного определения, так как для приготовления градуировочных образцов в методе стандартных добавок используют исходные пробы.

Метод стандартной добавки заключается в следующем: проводится анализ исследуемой пробы и анализ той же пробы с добавкой определяемого компонента.

Содержание анализируемого компонента рассчитывается по формуле [3]:

$$M_x = \frac{M_{\text{доб}} \cdot S_x}{(S_{(x+\text{доб})} - S_x)}$$

где M_x – масса анализируемого компонента в пробе,

$M_{\text{доб}}$ – масса стандартной добавки,

S_x и $S_{x+\text{доб}}$ – параметры хроматографических пиков (высота или площадь) аналитического компонента до и после добавки соответственно.

Для получения максимально точного результата рекомендуется, чтобы масса стандартной добавки была равной или превышала содержание анализируемого компонента

не более чем в 2 раза [3]. Предварительно необходимо провести анализы стандартных проб, чтобы доказать прямо пропорциональную зависимость аналитического сигнала анализируемого компонента от концентрации его в анализируемой пробе.

Чтобы увеличить точность определения, анализируют несколько образцов, получаемых из исходного путём введения в него нескольких последовательно увеличивающихся стандартных добавок.

Для расчёта концентрации определяемого вещества в варианте метода стандартной добавки, основанного на последовательных стандартных добавках, используют приём и выражение «экстраполяция результата на нулевую величину добавки». Его графическая интерпретация представлена на рисунке 1.

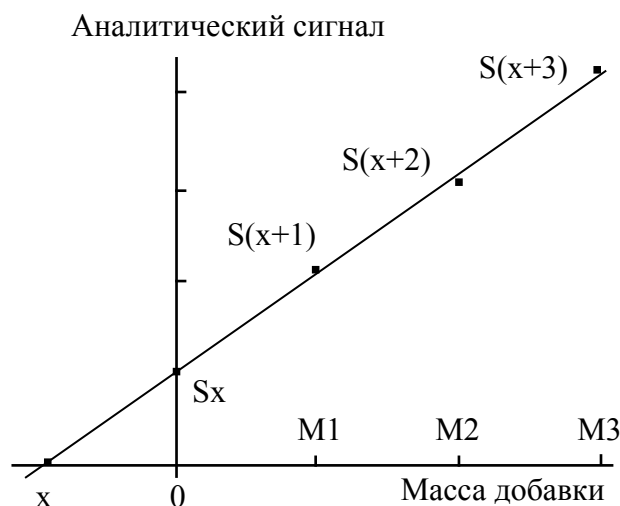


Рисунок 1. – Графическая интерпретация метода последовательных стандартных добавок

Если аналитический сигнал определяемого компонента в исходном образце ($M_{\text{доб}}=0$) равен S_x , а в результате добавок M_1, M_2, M_3 он возрастает до $S_{x+1}, S_{x+2}, S_{x+3}$ соответственно, то полученный набор данных может быть аппроксимирован уравнением линейной регрессии $S=a \cdot M_{\text{доб}}+b$. Пересечение соответствующей этому уравнению прямой с осью абсцисс даёт точку «x»; длина отрезка $\{x, 0\}$ отвечает содержанию аналита в исходном образце, $\{x, 0\}=S(M_{\text{доб}}=0)/a$.

Для того чтобы свести к минимуму неточности, возникающие при жидкостно-жидкостной экстракции аналитического

компонента из крови, к ней можно добавить внутренний стандарт. В этом случае по оси Y откладывается не сигнал от аналитического компонента, а отношение сигналов $S_{\text{(аналита)}}/S_{\text{(внутреннего стандарта)}}$. Внутренний стандарт должен отделяться от анализируемого компонента в условиях хроматографического разделения, а также иметь схожий с аналитом коэффициент экстракции.

Целью настоящей работы было изучить возможность количественного определения димедрола, клозапина и фенобарбитала методом добавки, а также подбор внутренних стандартов для определения указанных веществ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали кровь людей, умерших предположительно от отравления лекарственными или наркотическими веществами. Предварительное обнаружение токсиантов осуществляли методами тонкослойной и газовой хроматографии. Для дополнительного подтверждения предварительных данных проводили газохроматографический анализ с масс-спектрометрическим детектированием.

Для количественного определения использовали методы газовой хроматографии с термо-ионным детектором (ТИД), газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ-МС) и высокоэффективную жидкостную хроматографию.

Изолирование лекарственных веществ из крови проводили жидкость-жидкостной экстракцией. Экстракцию осуществляли из проб исследуемой крови, а также из проб исследуемой крови с добавками обнаруженного вещества. В двух случаях из трёх для компенсации возможных потерь при экстрагировании использовали добавку внутреннего стандарта.

Коэффициенты уравнения регрессии вида $Y = a + b \cdot X$, где Y – отношение площади пика токсиканта к площади пика внутреннего стандарта, X – концентрация добавки токсиканта в мкг/мл, а также коэффициент корреляции рассчитывали по формулам, приведенным в литературе [4, 5].

Случай 1. По материалам дела: «... был обнаружен труп Н лежащим на полу...».

В результате проведенных исследований (тонкослойная хроматография, газовая хроматография) в крови были обнаружены метадон и димедрол. В связи с тем, что в лаборатории отсутствовал стандартный образец метадона, нами было проведено количественное определение димедрола. В качестве внутреннего стандарта применяли трамадол. В условиях газохроматографического анализа он отделялся от димедрола. Время удерживания димедрола составляло 14 мин 11 с, трамадола – 15 мин 24 с. Определение выполняли на газовом хроматографе «Кристалл-5000.1» с ТИД. Условия определения: температура инжектора – 270°C, температура ТИД – 350°C. Температурный режим колонки: начальная температура – 135°C, длительность изотермы – 4 мин, нагрев с градиентом 13°C/мин

до температуры 200°C и далее с градиентом 6°C/мин до температуры 290°C, длительность изотермы – 15 минут. Газ-носитель – азот особой чистоты. Давление газа носителя: начальное – 84 кПа, длительность – 4 мин, повышение давления с градиентом 3,5 кПа/мин до значения 101,5 кПа, далее повышение давления с градиентом 1,6 кПа/мин до значения 125,6 кПа, длительность – 15 минут. Режим сброса пробы с инжектора – *spreet less*, задержка – 30 секунд. Расход водорода – 13 мл/мин, расход воздуха – 200 мл/мин. Колонка капиллярная, кварцевая, длина – 30 м, диаметр – 0,32 мм, неподвижная жидкая фаза – RTX-1. Обработку хроматограмм проводили с использованием штатного прикладного программного обеспечения «Хроматек Аналитик 1.5». В качестве аналитического отклика использовали площади хроматографических пиков. Площади пиков анализируемых компонентов приводили в единицах счёта соответствующего прикладного программного обеспечения. Анализируемый объём составлял 1 мкл.

Экстракцию проводили по следующей методике. В экстракционную пробирку вносили 1 мл раствора натрия гидроксида (1 моль/л), 1 мл воды, 1 мл раствора трамадола (внутренний стандарт) с концентрацией 100 мкг/мл и 2 мл исследуемой крови. Экстрагировали 2 мл гептана в течение 5 минут [6]. Центрифугировали при 2000 об/мин в течение 10 минут, отбирали 1,5 мл экстракта. Экстракт испаряли досуха, сухой остаток растворяли в 200 мкл этанола. Фиксировали площади пиков димедрола и трамадола.

Пробы крови с добавкой исследовали, как изложено выше. В этом случае вместо 1 мл воды добавляли по 1 мл раствора димедрола с концентрацией 10 и 20 мкг/мл.

Случай 2. По материалам дела: «... умерла по месту жительства... обнаружены упаковки таблеток «Азаледин...».

В крови и внутренних органах методами тонкослойной хроматографии, газовой хроматографии, а также ГХ-МС был обнаружен клозапин (азаледин). Количественное определение клозапина проводили методом ГХ-МС. В качестве внутреннего стандарта использовали амитриптилин. Выбор амитриптилина в качестве внутреннего стандарта обусловлен сходством метода изолирования – оба соединения экстрагируются из щелочной среды – и сходством химической структуры – оба

относятся к дибензозепинам. В условиях хроматографического анализа соединения хорошо отделялись друг от друга, время удерживания амитриптилина составляло 30,256 мин, клозапина – 42,654 мин.

Условия определения: газовый хроматограф ShimadzuGS 2010 Plus, автосамплер АОС-20i, квадрупольный масс-спектрометрический детектор ShimadzuGSMS-QP 2010 Ultra; колонка капиллярная кварцевая, длина 30 м, диаметр 0,32 мм, неподвижная жидкая фаза VF-5ms (95% метилсиликона, 5% фенилсиликона), температура инжектора – 280°C, температура интерфейса – 250°C, температура ионного источника – 270°C. Температурная программа колонки: начальная температура 100°C, длительность изотермы – 4 минуты, нагрев до температуры 200°C со скоростью набора температуры 13°C/мин, длительность изотермы – 6 минут, нагрев до температуры 290°C со скоростью набора температуры 6°C/мин, длительность изотермы – 30 минут. Газ-носитель – гелий, расход – 1,3 мл/мин. Режим работы масс-спектрометра: сканирование в диапазоне от 35 до 500 m/z, Scanspeed – 1666, Eventtime – 0,3 с. Режим ввода пробы – Spleetless, задержка сброса – 30 с. Объём ввода пробы – 1 мкл.

Экстракцию проводили по следующей методике. В экстракционную пробирку вносили 2 мл исследуемой крови, приливали 20 мкл водного раствора амитриптилина гидрохлорида с концентрацией 1 мг/мл (в пересчёте на амитриптин) и 50 мкл 96,4% этанола. Пробирку помещали в ультразвуковую ванну на 30 минут. По истечении указанного времени её извлекали, приливали 200 мкл 1 М раствора натрия гидроксида и 6 мл смеси гексана с изопентанолом, приготовленной в соотношении 50:1 [7]. Экстрагировали в течение 15 минут путём встряхивания, далее пробирку центрифугировали при 2000 об/мин в течение 15 минут. Отбирали 5 мл экстракта, испаряли растворитель в токе воздуха досуха. Сухой остаток растворяли в 1,5 мл ацетонитрила. Раствор экстракта анализировали методом ГХ-МС, фиксировали площади амитриптилина и клозапина. Экстракцию и анализ повторяли с новой порцией крови. Пробы крови с добавкой клозапина и внутренним стандартом готовили, как изложено выше: вместо 50 мкл 96,4% этилового спирта приливали по 50 мкл растворов клозапина с концентраци-

ями 200 и 600 мкг/мл. Концентрация добавки клозапина (без учёта разведения) в первом случае была равной 5 мкг/мл, во втором – 15 мкг/мл.

Случай 3. По материалам дела: «... Обнаружен в доме...».

В крови и внутренних органах методами тонкослойной хроматографии, газовой хроматографии, а также ГХ-МС был обнаружен фенobarбитал.

Количественное определение фенobarбитала проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Условия определения: жидкостный хроматограф «Varian Pro Star», объём дозирующей петли – 20 мкл; колонка Ultra C18, размер частиц 3 мкм, длина колонки 150 мм, диаметр 3,2 мм, расход подвижной фазы – 0,5 мл/мин. Элюирование градиентное: 0–5 минут – соотношение вода-ацетонитрил было 70:30, от 5 до 20 минут соотношение вода-ацетонитрил изменилось до 30:70, при указанном соотношении элюирование проводили в течение 2-х минут. Детектор – спектрофотометрический, диодная матрица. Хроматограмму регистрировали при 240 нм. Спектр регистрировали с частотой, равной 800 мс; диапазон регистрации – 200–400 нм, интервал – 4 нм. Обработку проводили с использованием прикладного программного обеспечения «Star Chromatography Work Station (Version 5.52)» при соотношении сигнал/шум, равном 3. Время удерживания фенobarбитала составляло 5,969 мин.

Экстракцию проводили по следующей методике. В экстракционную пробирку вносили 1 мл исследуемой крови, приливали 100 мкл 30% раствора этанола. Пробирку помещали в ультразвуковую ванну на 30 минут. К пробе приливали 5 мл дихлорметана [7]. Экстрагировали в течение 15 минут. Центрифугировали содержимое при 3000 об/мин в течение 15 минут. Отбирали 3 мл экстракта, переносили в вials. Экстрагент испаряли в токе воздуха досуха. Сухой остаток растворяли в 1 мл ацетонитрила. Хроматографировали, как изложено выше. Регистрировали площадь пика фенobarбитала в пробе крови. Экстракцию повторяли с новой порцией крови, полученный раствор экстракта анализировали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии, регистрировали площадь пика фенobarбитала. Пробы крови с добавкой фенobarбитала готовили, как изложено выше: вместо 100 мкл 30% этилово-

го спирта приливали по 100 мкл растворов фенobarбитала с концентрациями 300 и 600 мкг/мл. Концентрация добавки клозапина в первом случае была равной 30 мкг/мл, во втором – 60 мкг/мл. Во всех случаях фиксировали площадь пика фенobarбитала.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Результаты исследования по **случаю №1** представлены в таблице 1, градуировочный график по данным таблицы 1 представлен на рисунке 2.

Таблица 1. – Концентрация добавки димедрола, площади пиков димедрола и трамадола, отношение площадей пиков димедрола к площадям пиков трамадола (площади пиков – средние значения двух параллельных определений)

Концентрация добавки димедрола, $C_{\text{дим}}$, мкг/мл	Площадь пика димедрола, $S_{\text{дим}}$	Площадь пика трамадола, $S_{\text{трам}}$	$S_{\text{дим}}/S_{\text{трам}}$
0	68,0	2206,5	0,030818
10	331,0	2167,0	0,152746
20	719,5	2668,5	0,269627

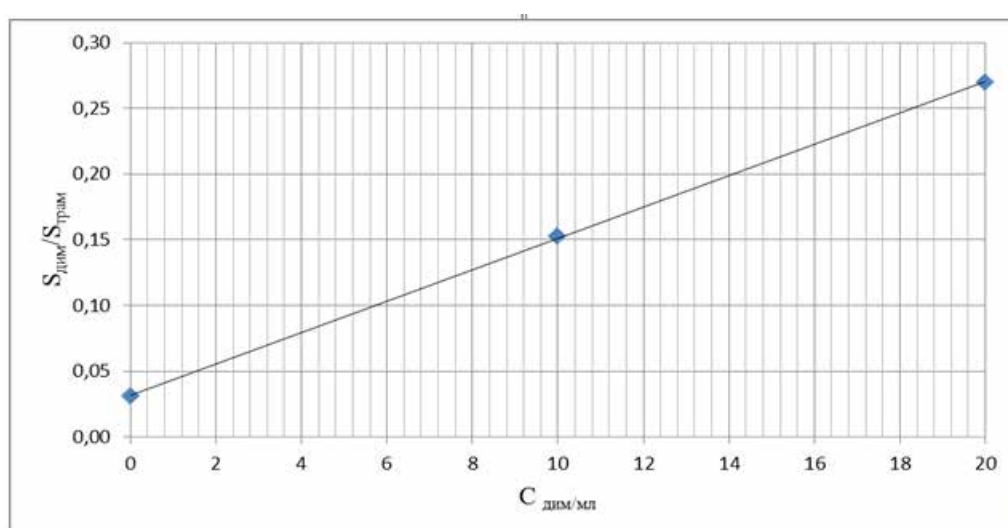


Рисунок 2. – Зависимость отношения площадей пиков димедрола к пикам трамадола (внутренний стандарт) от концентрации добавки димедрола. По оси абсцисс – концентрация добавки димедрола, по оси ординат – отношение площадей пиков

Коэффициенты уравнения регрессии, а также дисперсии равны: $a = 0,0317$, $S_a = 0,0019$, $b = 0,0119$, $S_b = 0,0001$, $S_{\text{ост}}^a = 0,0021$.

Уравнение регрессии имело вид: $Y = 0,0317 + 0,0119 \cdot X$. Коэффициент корреляции $r = 0,999$.

Концентрацию димедрола в исследуемой крови рассчитывали при условии $0 = 0,0317 + 0,0119 \cdot X$. Тогда $X = \lfloor 0,0317/0,0119 \rfloor = 2,7$ мкг/мл.

Стандартное отклонение полученного результата $S_x(A)$, было равно 0,2 мкг/мл. Окончательный результат: содержание димедрола в крови – 2,7 мкг/мл, стандартное отклонение полученного результата – $\pm 0,2$ мкг/мл.

Результаты исследования по **случаю №2** представлены в таблице 2, градуи-

ровочный график по данным таблицы 2 представлен на рисунке 3.

Коэффициенты уравнения регрессии, а также дисперсии равны: $a = 1,4659$, $S_a = 0,0296$, $b = 0,1122$, $S_b = 0,0032$, $S_{\text{ост}}^a = 0,0351$.

Уравнение регрессии имело вид: $Y = 1,4659 + 0,1122 \cdot X$. Коэффициент корреляции $r = 0,999$.

Концентрацию клозапина в крови рассчитывали при условии $0 = 1,4659 + 0,1122 \cdot X$. Тогда $X = \lfloor 1,4659/0,1122 \rfloor = 13,1$ мкг/мл.

Стандартное отклонение полученного результата $S_x(A)$ равно 0,6 мкг/мл. Окончательный результат: содержание клозапина в крови – 13,1 мкг/мл, стандартное отклонение полученного результата – $\pm 0,6$ мкг/мл.

Таблица 2. – Концентрация добавки клозапина, площади пиков клозапина и амитриптилина, отношение площадей пиков клозапина к площадям пиков амитриптилина (площади пиков – средние значения двух параллельных определений)

Концентрация добавки клозапина, $C_{кл}$, мкг/мл	Площадь пика клозапина, $S_{кл}$	Площадь пика амитриптилина, $S_{амтр}$	$S_{кл}/S_{амтр}$
0	4435896	2987914	1,484613
5	5455358	2729122	1,998943
15	9373611	2967440	3,158821

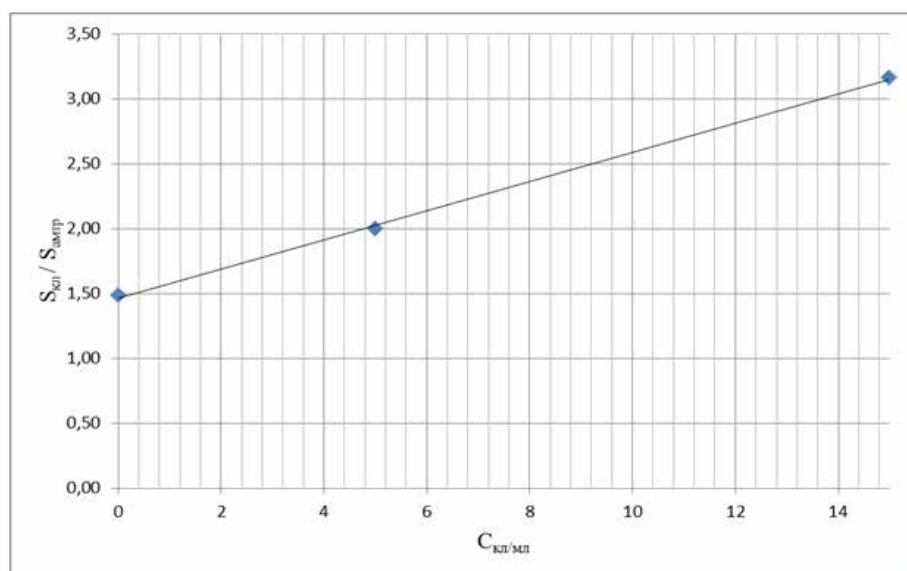


Рисунок 3. – Зависимость отношения площадей пиков клозапина к пикам амитриптилина (внутренний стандарт) от концентрации добавки клозапина. По оси абсцисс – концентрация добавки клозапина, по оси ординат – отношение площадей пиков

Результаты исследования по **случаю № 3** представлены в таблице 3, градуировочный график по данным таблицы 3 представлен на рисунке 4.

Коэффициенты уравнения регрессии, а также дисперсии были равны: $a = 2143555,58$, $S_a = 81081,13$, $b = 44167,88$, $S_b = 2093,51$, $S_{ост} = 88819,93$.

Уравнение регрессии имело вид: $Y = 2143555,58 + 44167,88 \cdot X$. Коэффициент корреляции $r = 0,997$.

Концентрацию фенобарбитала в крови рассчитывали при условии $0 = 2143555,58 + 44167,88 \cdot X$. Тогда $X = |2143555,58 / 44167,88| = 48,5$ мкг/мл.

Стандартное отклонение полученного результата $S_x(A)$ было равно 17,1 мкг/мл.

Окончательный результат: содержание фенобарбитала в крови – 48,5 мкг/мл, стандартное отклонение полученного результата – $\pm 17,1$ мкг/мл.

Таблица 3. – Концентрация добавки фенобарбитала, площади пиков фенобарбитала (площади пиков – средние значения двух параллельных определений)

Концентрация добавки фенобарбитала, $C_{фен}$, мкг/мл	Площадь пика фенобарбитала, $S_{фен}$
0	2107295,0
30	3541113,0
60	4757367,5

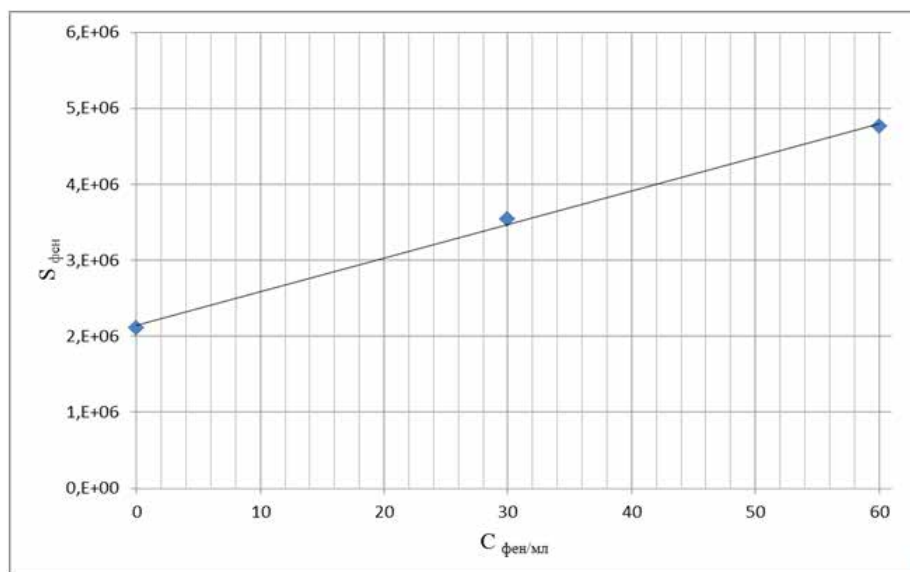


Рисунок 4. – Зависимость площади пиков фенобарбитала от концентрации добавки фенобарбитала. По оси абсцисс – концентрация добавки фенобарбитала, по оси ординат – площади пиков

ОБСУЖДЕНИЕ

Как видно из полученных результатов, для всех изученных соединений зависимость аналитического сигнала от концентрации практически линейна, о чём свидетельствуют значения коэффициентов корреляции. Двух добавок определяемых соединений вполне достаточно для получения уравнения регрессии и расчёта искомым концентраций.

Стандартные отклонения составили: для димедрола – 7% от полученного результата, клозапина – 4% и фенобарбитала – 32%. Такое высокое значение стандартного отклонения для фенобарбитала обусловлено, по-видимому, тем, что в этом случае не удалось подобрать внутренний стандарт, удовлетворяющий необходимым требованиям. Использование внутреннего стандарта существенно повышает точность полученного результата.

Кроме того, использование метода добавок позволяет уменьшить число определений для получения конечного результата. Если использовать метод градуировки, то для построения градуировочного графика необходимо как минимум 4 концентрации с последовательно увеличивающимися значениями. Для каждой концентрации необходимо провести 2 параллельных измерения, таким образом, для построения градуиро-

вочного графика необходимо 8 измерений. К этим 8 измерениям необходимо добавить 2 параллельных измерения исследуемой биопробы, таким образом, необходимо провести как минимум 10 измерений.

В случае метода стандартной добавки минимально можно ограничиться шестью измерениями.

Для выбора концентрации добавок можно использовать следующий алгоритм. Концентрация первой добавки может быть равной или двукратной смертельной концентрации, вторая добавка – трёх-четырёхкратная смертельная концентрация. Если при предварительном исследовании делается промежуточный вывод, что концентрация токсиканта лежит в пределах терапевтической, в качестве концентрации первой добавки можно использовать величину токсической концентрации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Показана возможность количественного определения димедрола, клозапина и фенобарбитала в крови методом добавки и добавки с внутренним стандартом.

2. Предложены внутренние стандарты для количественного определения димедрола и клозапина в крови, а также методики изолирования димедрола, клозапина и фенобарбитала из крови.

3. Проведена статистическая обработка полученных результатов. Показана более высокая точность количественного определения с внутренним стандартом по сравнению с методом добавки без использования внутреннего стандарта.

SUMMARY

M. A. Kolkov

THE USE OF STANDARD ADDITION METHOD

IN TOXICOLOGICAL ANALYSIS

Quantitative determination methods of diphenhydramine, clozapine and phenobarbital in people's cadaveric blood whose death, in forensic surgeons' opinion, has been caused by medicines overdosage have been presented in the article. Quantitative determination has been carried out by the standard addition method. The research has been carried out by the methods of thin-layer, gas (GC) and high performance liquid chromatography (HPLC) and also by the method of gas chromatography with mass-spectrometric detection (GC-MS). The use of internal standards increases the accuracy of quantitative determination. The techniques of isolation and quantitative determination of diphenhydramine, clozapine and phenobarbital may be used in the practical work of toxicological laboratories.

Keywords: quantitative analysis, standard addition method, GC, GC-MS, HPLC.

ЛИТЕРАТУРА

1. Therapeutic and toxic blood concentration of more than 800 drugs and other xenobiotics/ M. Schulz, A. Schmoldt //

Die Pharmazie. – 2003. – V. 58, № 7. – P. 445–474.

2. Еремин, С. К. Анализ наркотических средств / С. К. Еремин, Б. Н. Изотов, Н. В. Веселовская. – М.: «Мысль», 1993. – 271 с.

3. Зенкевич, И. Г. Особенности метода стандартной добавки для количественного определения аналитов в сложных матрицах, обладающих сорбционными свойствами / И. Г. Зенкевич, Т. Е. Морозова // Аналитика и контроль. – 2010. – № 3 (14). – С. 164–171.

4. Берштейн, И. Я. Спектрометрический анализ в органической химии / И. Я. Берштейн, Ю. Л. Каминский. – Ленинград: «Химия», Ленинградское отделение, 1986. – 199 с.

5. Дёрффель, К. Статистика в аналитической химии / К. Дёрффель. – М.: «Мир», 1994. – 269 с.

6. Изолирование и определение различных наркотических и лекарственных веществ после кислотного гидролиза биологического материала / А. И. Барцев [и др.] // Судебно-медицинская экспертиза. – 1998. – Т. 41, № 6. – С. 26–28.

7. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material / Executive Development Editor Jo Watts. Fourth Edition. Pharmaceutical Press, 2011. – 2474 p.

Адрес для корреспонденции:

210017, Республика Беларусь,
г. Витебск, ул. Гагарина, 12,
Управление по Витебской области,
Государственный комитет
судебных экспертиз Республики Беларусь
тел. +375 33 316 06 27,
Колков М. А.

Поступила 18.12.2017 г.